

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-043189

(43)Date of publication of application : 14.02.1997

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

G01N 27/30

G01N 27/416

(21)Application number : 07-194893

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 31.07.1995

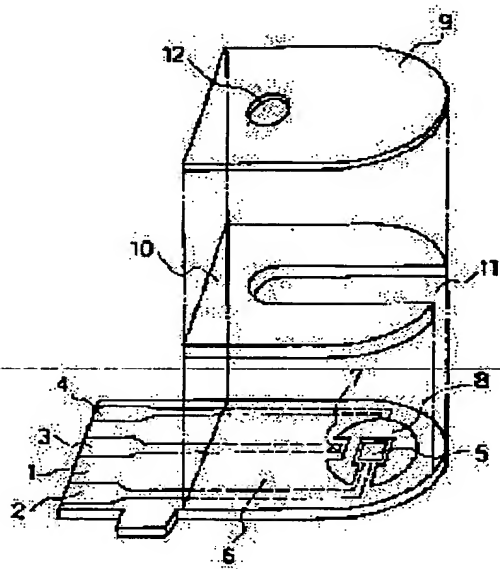
(72)Inventor : IKEDA MAKOTO  
YOSHIOKA TOSHIHIKO  
NANKAI SHIRO

## (54) BIOSENSOR AND METHOD FOR DETERMINING SUBSTRATE USING IT

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a reliable method for determining substrate by suppressing the error and scattering in a measurement result due to the selection of the electrode material of a reference electrode to be used and a manufacturing method when determining the substrate by a three-electrode-type disposable sensor.

**SOLUTION:** In a method for determining a substrate by detecting a substance temperature concentration change when reacting enzyme to a substrate in a sample based on an electrochemical response obtained by applying a potential to a working electrode 5 using a biosensor with an electrode system having the working electrode 5, a counter electrode 8, and a reference electrode 7 made of silver formed on an insulation substrate 1 and a reaction layer containing at least enzyme, an anode potential is applied to the reference electrode 7 before applying a potential to the working electrode 5, thus causing reaction with a chloride contained in the sample or that provided at the sensor and manufacturing silver/silver chloride electrode on the reference electrode 7.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

16.11.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3437016

[Date of registration]

06.06.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-43189

(43) 公開日 平成9年(1997)2月14日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327			G 0 1 N 27/30	3 5 3 Z
27/30	3 1 1			3 1 1 Z
27/416				3 5 3 R
			27/46	3 3 6 B

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平7-194893

(22) 出願日 平成7年(1995)7月31日

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 池田 信

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

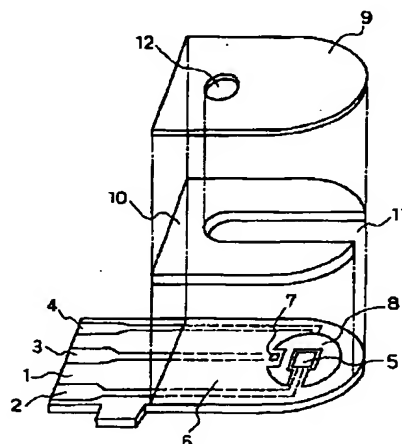
(74) 代理人 弁理士 東島 隆治 (外1名)

(54) 【発明の名称】 バイオセンサおよびそれを用いた基質の定量方法

(57) 【要約】

【課題】 三電極式使い捨て型センサにて基質の定量を行う際、用いる参照極の電極材料や作製方法の選定に起因して生じる測定結果の誤差およびばらつきを抑制し、信頼性の高い基質の定量法を提供する。

【解決手段】 絶縁性の基板上に形成された作用極、対極および銀からなる参照極を有する電極系と、少なくとも酵素を含む反応層とを具備するバイオセンサを用いて、酵素と試料中の基質との反応に際しての物質濃度変化を、作用極に電位を印加することで得られる電気化学的応答に基づいて検知して、基質を定量する方法において、作用極に電位を印加する前に、参照極にアノード電位を印加することにより試料中に含まれる塩化物またはセンサに備える塩化物と反応させて、参照極上に銀/塩化銀電極を作製する。



1 基板

2,3,4 リード

5 作用極

6 絶縁層

7 参照極

8 対極

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 絶縁性の基板上に形成された作用極、対極および参照極を有する電極系と、少なくとも酵素を含む反応層とを具備し、前記酵素と試料中の基質との反応に際しての物質濃度変化を、前記電極系で電気化学的に検知するバイオセンサにおいて、前記参照極が銀からなり、前記反応層が水溶性塩化物を含むことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 反応層が、電子受容体を含む請求項1に記載のバイオセンサ。

【請求項3】 反応層が、親水性高分子を含む請求項1または2に記載のバイオセンサ。

【請求項4】 絶縁性の基板上に形成された作用極、対極および銀からなる参照極を有する電極系と、少なくとも酵素を含む反応層とを具備するバイオセンサを用いて、前記酵素と試料中の基質との反応に際しての物質濃度変化を、作用極に電位を印加することで得られる電気化学的応答に基づいて検知することにより、前記基質を定量する方法において、作用極に電位を印加する前に、参照極にアノード電位を印加することにより試料中に含まれる水溶性塩化物またはセンサに備える水溶性塩化物と反応させて、参照極上に銀/塩化銀電極を作製する工程を設けたことを特徴とする基質の定量方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中の基質について、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施するためのバイオセンサおよび同バイオセンサを用いた基質の定量方法に関する。

**【0002】**

【従来の技術】基質の定量法の一例として、グルコースの定量法について説明する。電気化学的なグルコースの定量法としては、グルコースオキシダーゼ（EC1.1.3.4：以下GODと略す）と酸素電極あるいは過酸化水素電極とを組み合わせた方式が一般的に知られている（例えば、鈴木周一編「バイオセンサー」講談社）。GODは、酸素を電子受容体として基質であるβ-D-グルコースをD-グルコノ-δ-ラクトンに選択的に酸化する。この反応に伴い、酸素は過酸化水素に還元される。この時の酸素消費量を酸素電極によって測定するか、もしくは過酸化水素の生成量を過酸化水素電極によって測定することでグルコースの定量が行われる。

【0003】しかしながら上記方法では、その反応過程からも推測できるように、測定結果は溶存酸素濃度の影響を大きく受け、酸素のない条件下では測定が不可能となる。そこで、酸素を電子受容体として用いず、フェリシアン化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体等の有機化合物や金属錯体を電子受容体として用いる新しいタイプのグルコースセンサが開発されてきた。このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子受容体の

還元体を電極で酸化することにより、その酸化電流からグルコース濃度を求めることができる。

【0004】さらに、このような電子受容体を酸素の代わりに用いることで、既知量のGODと電子受容体を安定な状態で正確に電極上に担持させることが可能となる場合があり、この場合電極系と反応層を乾燥状態に近い状態で一体化することができる。この技術に基づいた使い捨て型グルコースセンサは、測定器に挿入されたセンサチップに検体試料を導入するだけで容易にグルコース濃度を測定することができるので、近年多くの注目を集めている。このような手法は、グルコースの定量評価だけに限らず、他の基質の定量評価にも応用可能であり、現在多くの研究対象となっている。

**【0005】**

【発明が解決しようとする課題】上記のように電子受容体を用い、さらに電極系と反応層を一体化する技術により、基質の簡便な電気化学的定量評価が可能となった。また、三電極式の導入に伴い、さらに高精度な評価が可能となってきた。しかしながら、三電極式使い捨て型センサにて定量を行う際、用いる参照極の電極材料および作製方法の選定に起因して、測定結果に誤差およびばらつきが生じることがあった。

**【0006】**

【課題を解決するための手段】本発明は、絶縁性の基板上に形成された作用極、対極および銀からなる参照極を有する電極系と、少なくとも酵素を含む反応層とを具備するバイオセンサを用いて、前記酵素と試料中の基質との反応に際しての物質濃度変化を、作用極に電位を印加することで得られる電気化学的応答に基づいて検知することにより、前記基質を定量する方法において、作用極に電位を印加する前に、参照極にアノード電位を印加することにより試料中に含まれる水溶性塩化物またはセンサに備える水溶性塩化物と反応させて、参照極上に銀/塩化銀電極を作製するものである。

【0007】また、ここに用いるバイオセンサは、絶縁性の基板上に形成された作用極、対極および参照極を有する電極系と、少なくとも酵素を含む反応層とを具備し、参照極が銀からなり、反応層が水溶性塩化物を含んでいる。反応層は、電子受容体を含むことが好ましい。また、反応層は、親水性高分子を含むことが好ましい。

【0008】三電極式使い捨て型センサの参照極にカーボン、銀、白金などの分極性電極を単独で導入する場合、その電極界面で生ずる電極電位、すなわち基準となる電位は試料中に含まれるイオンの活量に大きく依存する。故に、試料中の溶存種、および濃度の違いによりその電極電位が大きく変化する場合がある。そこで、本発明では、理想非分極性電極として、通常よく用いられる銀/塩化銀電極をセンサの参照極に導入することにより、参照極電位を安定させ、センサ応答特性を向上するものである。

## 【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を具体例により説明する。

【実施例1】定量法の一例として、グルコースの定量について説明する。本実施例において用いた電極系の構成を図1に示す。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3、および4を形成した。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷して作用極5、および対極8を形成した。作用極5は、リード2と接触しており、対極8はリード4と接触している。次に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成した。絶縁層6は、作用極5の外周部を覆っており、これによって作用極5の露出部分の面積を一定に保っている。また、リード3の先端を露出させることにより、参照極7を形成した。さらに、絶縁層6は、リード2、3、および4を部分的に覆っている。

【0010】次に、前記電極系上にカルボキシメチルセルロース（以下CMCと略す）の水溶液を滴下し、乾燥させることでCMC層を形成した。さらに、前記電極系上に、酵素としてGOD、電子受容体としてフェリシアン化カリウムを含有する水溶液を滴下し、乾燥させることで反応層を形成した。次に、反応層上に試料液の供給をより一層円滑にするために、レシチンの有機溶媒溶液、例えばトルエン溶液を試料供給部（センサ先端部）から反応層上にわたって広げ、乾燥させることでレシチン層を形成した。次いで、カバー9およびスペーサ10を図1中、一点鎖線で示すような位置関係をもって基板1に接着してグルコースセンサを作製した。

【0011】このセンサに、試料液として人血液3 $\mu$ lを試料供給孔11より供給した。試料液は、空気孔12部分まで達し、電極系上の反応層が溶解した。試料液の供給と同時に、参照極7に、対極8を基準にして一定のアノード電位を印加した。これにより参照極の銀の表面には、人血液に含まれる塩素イオンと反応して生成した塩化銀が析出し、銀/塩化銀電極が形成される。所定時間経過後、参照極7への電位印加を停止した。さらに所定時間経過後、作用極5に参照極7を基準にして一定の電位を印加し、5秒後の電流値を測定した。フェリシアン化イオン、GOD、および人血液中のグルコースが反応し、グルコースがグルコノラクトンに酸化され、フェリシアン化イオンがフェロシアン化イオンに還元される。このフェロシアン化イオンを作用極5にて酸化することで電流応答が得られる。その結果、試料液中のグルコース濃度に依存した電流応答が得られた。この応答の変動係数は2.4%であった。一方、参照極7に塩化銀を析出させないで測定した比較例では4.0%であった。このように、本発明によれば、より小さい変動係数、すなわち、センサ応答のばらつきの減少が確認された。

【0012】【実施例2】実施例1と同様に、絶縁性基板上に電極系を作製した。次に、前記電極系上にCMCの水溶液を滴下し、乾燥させることでCMC層を形成した。さらに、前記電極系上に、酵素としてGOD、塩化物として塩化ナトリウムをそれぞれ含有する水溶液を滴下し、乾燥させることで反応層を形成した。次に、反応層上に試料液の供給をより一層円滑にするために、レシチンの有機溶媒溶液、例えばトルエン溶液を試料供給部（センサ先端部）から反応層上にわたって広げ、乾燥させることでレシチン層を形成した後、カバー9およびスペーサ10を図1中、一点鎖線で示すような位置関係をもって基板に接着してグルコースセンサを作製した。

【0013】このセンサに試料液としてグルコース水溶液3 $\mu$ lを試料供給孔11より供給した。試料液は空気孔12部分まで達し、電極系上の反応層が溶解した。試料液の供給と同時に、参照極7に、対極8を基準にして一定のアノード電位を印加した。これにより反応層から溶出した塩素イオンと銀が反応して塩化銀が析出し、銀/塩化銀電極が参照極7上に形成される。所定時間経過後、参照極7への電位印加を停止した。さらに所定時間経過後、作用極5に参照極7を基準にして一定の電位を印加し、5秒後の電流値を測定した。GOD、酸素およびグルコースが反応し、グルコースがグルコノラクトンに酸化され、酸素が過酸化水素に還元される。この過酸化水素を作用極5にて酸化することで電流応答が得られる。その結果、試料液中のグルコース濃度に依存した電流応答が得られた。

【0014】この応答の変動係数は2.4%であった。一方、参照極7に塩化銀を析出させないで測定した比較例では4.0%であった。このように反応層に塩化物として塩化ナトリウムを含ませることによって、試料液に塩化物を含まない場合においても実施例1と同様の測定を行うことができた。また、塩化ナトリウムをカバーもしくは基板上に担持した場合においても、同様の結果が得られた。

【0015】上記実施例では、CMC層を有するセンサについて記述したが、CMC層を除いたセンサにおいても、グルコース濃度に依存するセンサ応答が得られた。また親水性高分子としてCMCを用いたが、これに限定されることはなく、ポリリジン等のポリアミノ酸、ポリビニルアルコール、ポリスチレンスルホン酸なども使用できる。また、電子受容体としてフェリシアン化カリウムを用いたセンサについて記述したが、フェリシアン化カリウム以外に、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセン誘導体なども使用できる。酸素を電子受容体とした場合にもセンサ応答が得られる。

【0016】また、酵素としては、上記実施例に示したグルコースオキシダーゼ以外に、乳酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼな

ども使用できる。一方、添加する塩化物としては、実施例に示した塩化ナトリウム以外に、塩化カリウム、塩化リチウム、塩化カルシウムなども用いることができる。上記実施例では、電極系の一例を図1に示したが、電極、リードの配置はこれらに限定されるものではない。さらに、上記実施例ではカバー部材を接着させたセンサについて述べたが、これに限定されることなく、カバー部材がないセンサにおいても、グルコース濃度に依存するセンサ応答が得られる。上記実施例においては、試料液に反応層を溶解させる方式について示したが、これに制限されることなく、固定化によって試料液に不溶化させた場合にも適用することができる。

【0017】

【発明の効果】以上のように本発明によると、高い信頼性を有する基質の定量を行なうことができる。

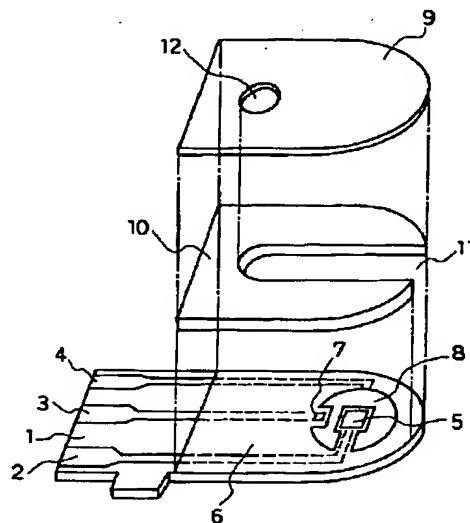
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例に用いたグルコースセンサの反応層を除いた分解斜視図である。

【符号の説明】

- 1 絶縁性の基板
- 2、3、4 リード
- 5 作用極
- 6 絶縁層
- 7 参照極
- 8 対極
- 9 カバー
- 10 スペーサ
- 11 試料供給孔
- 12 空気孔

【図1】



- 1 基板
- 2,3,4 リード
- 5 作用極
- 6 絶縁層
- 7 参照極
- 8 対極